Chemical Constituents of Soluble Nutrients in Irrigation Water versus Changes after Storage

M.A. Nelson and A.H. El-Shaarawi

85-1687/

Environment Canada Environnement Canada

Shipboard Analysis of Soluble Nutrients in Lake Water versus Analysis after Storage

M.A. Neilson and A.H. El-Shaarawi

TECHNICAL BULLETIN NO. 133

INLAND WATERS DIRECTORATE
ONTARIO REGION
WATER QUALITY BRANCH
BURLINGTON, ONTARIO, 1984

(Disponible en français sur demande)

© Minister of Supply and Services Canada 1984

Cat. No. En 36-503/133E

ISBN 0-662-13428-1

Contents

	Page
ABSTRACT	v
RÉSUMÉ	v
INTRODUCTION	1
METHODS	1
The sign test	3
Estimation of the size of the difference	3
Confidence interval for the difference	3
RESULTS AND DISCUSSION	3
ACKNOWLEDGMENTS	5
REFERENCES	5

Tables

1. Detection limits, number (and percentage) of samples reported below these levels and medians of shipboard and stored (laboratory) sample analyses 4

2. Summary of the statistical analyses of the three nutrients 4

Illustrations

Figure 1. The empirical cumulative distribution functions for the differences between the shipboard and stored sample analyses (April 26-30) 2

Figure 2. The empirical cumulative distribution functions for the differences between the shipboard and stored sample analyses (November 19-24) 2

Abstract

Water samples were collected from Lake Ontario during April and November, filtered (0.45 μm) and immediately analyzed onboard ship for the nutrients soluble reactive phosphorus, nitrate plus nitrite, and ammonia. Replicates were stored in glass bottles at 4°C and reanalyzed within eight days. Statistical analysis showed that soluble reactive phosphorus decreased by 11% and 13% and nitrate plus nitrite by 7% and 6%, whereas ammonia increased by 75% on one cruise and decreased by 37% on the other.

Résumé

Des échantillons d'eau ont été recueillis dans le lac Ontario en avril et en novembre, filtrés (0.45 μm) et analysés immédiatement à bord du bateau pour en déterminer les éléments nutritifs suivants : phosphore réactif soluble, nitrates et nitrites et ammoniac. Des doubles ont été conservés dans des bouteilles de verre à 4°C et analysés dans l'espace de huit jours. L'analyse statistique montre que la teneur en phosphore réactif soluble a diminué de 11 % et de 13 % et celle des nitrates et des nitrites de 7 % et de 6 % alors que celle de l'ammoniac a augmenté de 75 % dans le cas d'une expédition et diminué de 37 % dans l'autre.

Shipboard Analysis of Soluble Nutrients in Lake Water versus Analysis after Storage

M.A. Neilson and A.H. El-Shaarawi

INTRODUCTION

Considerable research (Eichholz *et al.*, 1965; Thayer, 1970; Bowditch *et al.*, 1976; Macdonald *et al.*, 1980) has been conducted to study the effect of preservation and storage on the chemical characteristics of water samples. Soluble reactive phosphorus (SRP), nitrate plus nitrite ($NO_3 + NO_2$) and ammonia (NH_3) have received particular attention (Murphy and Riley, 1956; Gilmartin, 1967; Jenkins, 1968; Howe and Holley, 1969; Thayer, 1970; Armstrong, 1972; Degobbis, 1973; Klingaman and Nelson, 1976). Stored without treatment, the concentration of these nutrients can undergo significant change. These changes are rapid, occurring within 30 min of sampling (Collier and Marvin, 1953).

There has been little agreement concerning the optimal preservation technique for these nutrients. To stabilize the SRP content of water samples, Collier and Marvin recommended quick-freezing and storage at sub-zero temperatures. Strickland and Parsons (1968) advised analysis within 2 h of sampling but agreed that freezing would stabilize the sample for several months. Gilmartin (1967) and Philbert (1973), in studying the effect of freezing on nutrient concentrations, found decreased SRP levels in the thawed samples. Various sources suggested mercuric chloride as an effective preservative in conjunction with either refrigeration (Environmental Protection Agency, 1971; Klingaman and Nelson, 1976) or freezing (Jenkins, 1968; American Public Health Association, 1971). Henriksen (1969), however, found that in the presence of HgCl, SRP levels increased. Bowditch *et al.* (1976) determined the most acceptable preservation technique to be storage in glass bottles at 4°C. Yet Murphy and Riley (1956) and Klingaman and Nelson (1976) reported large changes in SRP concentrations using this technique. Murphy and Riley (1956) considered storing samples at 20°C, in the dark, with the addition of various preservatives (sodium fluoride, chloroform, aluminum hydroxide and thorium carbonate). Their conclusion, only to be refuted by Jenkins (1968), was that chloroform (0.7% v/v) worked best.

To preserve nitrogen samples, Bowditch *et al.* (1976) recommended storage at 4°C. Klingaman and Nelson (1976) and Thayer (1970), however, found that large concentration changes resulted. Jenkins (1968) advised the addition of mercuric chloride, prior to refrigeration, for short-term storage of ammonia, nitrate plus nitrite and, except for nitrite samples, sulphuric acid for long-term storage. Although this met with acceptance from Howe and Holley (1969) and the American Public Health Association (1971), it had previously been found to be inadequate for stabilizing ammonia (Kreps, 1934; Cooper, 1937; Redfield and Keys, 1938). Freezing was suggested as an alternative (Marvin and Proctor, 1965; Klingaman and Nelson, 1976), but Degobbis (1973) and Newell (1967) reported concentration changes with increased variability attributed to the rupturing of plant and animal cells during freezing and thawing. Phenol was found to stabilize NH_3 concentrations for up to two weeks (Degobbis, 1973).

The Water Quality Branch, Ontario Region, conducts a wide variety of studies requiring measurement of the phosphorus and nitrogen levels in water. In light of the inconclusiveness of these studies, the analyses of soluble reactive phosphorus, nitrate plus nitrite, and ammonia are performed, whenever possible, in the field at the time of sampling. As this is not always convenient, however, samples are sometimes collected and stored at 4°C. A comparative study was initiated in 1982 to determine whether changes occur in the concentration of these nutrients as a result of storage. In 1982, during the April 26-30 and November 19-24 Lake Ontario surveillance cruises, samples were collected for the analysis of these nutrients. The resulting data were then subjected to statistical analysis to determine (i) whether there were real changes in the concentration of SRP, ($NO_3 + NO_2$) and NH_3 as a result of storage, and if so, the magnitude of the changes and (ii) a confidence interval for the magnitude of change.

METHODS

Sampling was conducted at 94 stations on Lake Ontario at depths of 1 m, 10 m, 25 m, as well as 10 m and 2 m from the bottom during isothermal conditions and at 1 m, 1 m above and 1 m below the thermocline, and 10 m and 2 m from the bottom during stratified conditions.

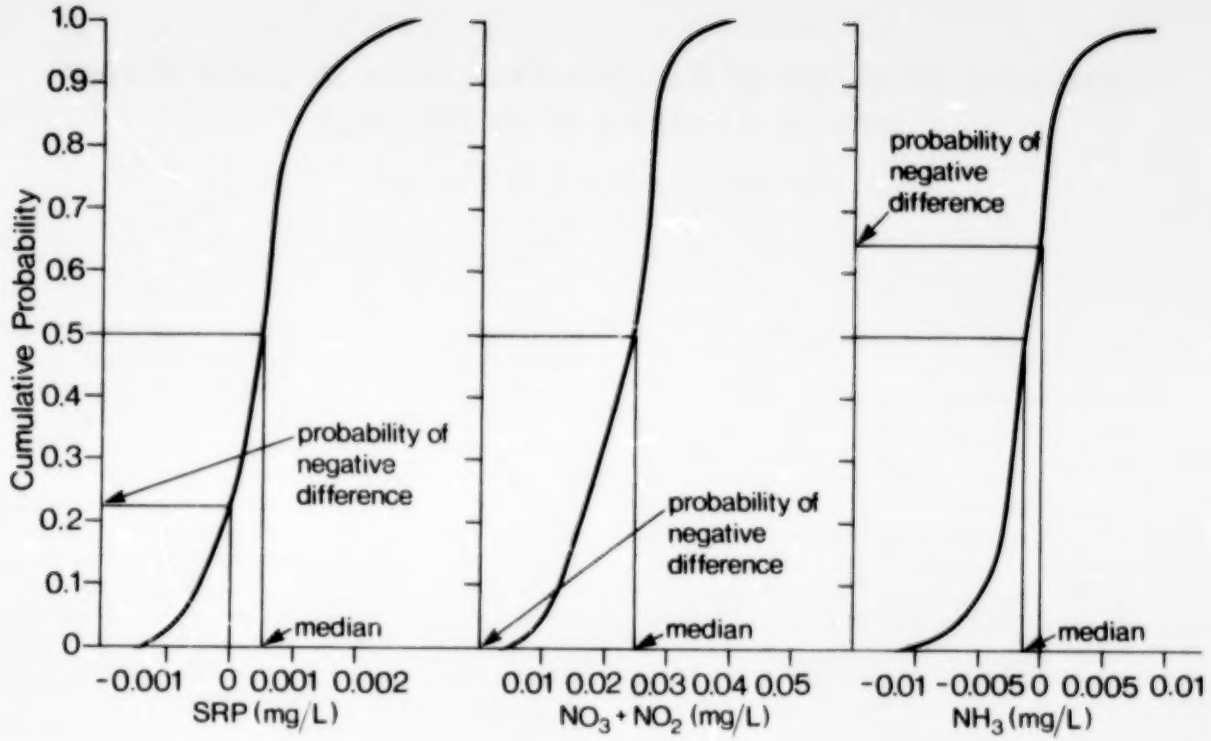

Figure 1. The empirical cumulative distribution functions for the differences between the shipboard and stored sample analyses (April 26-30).

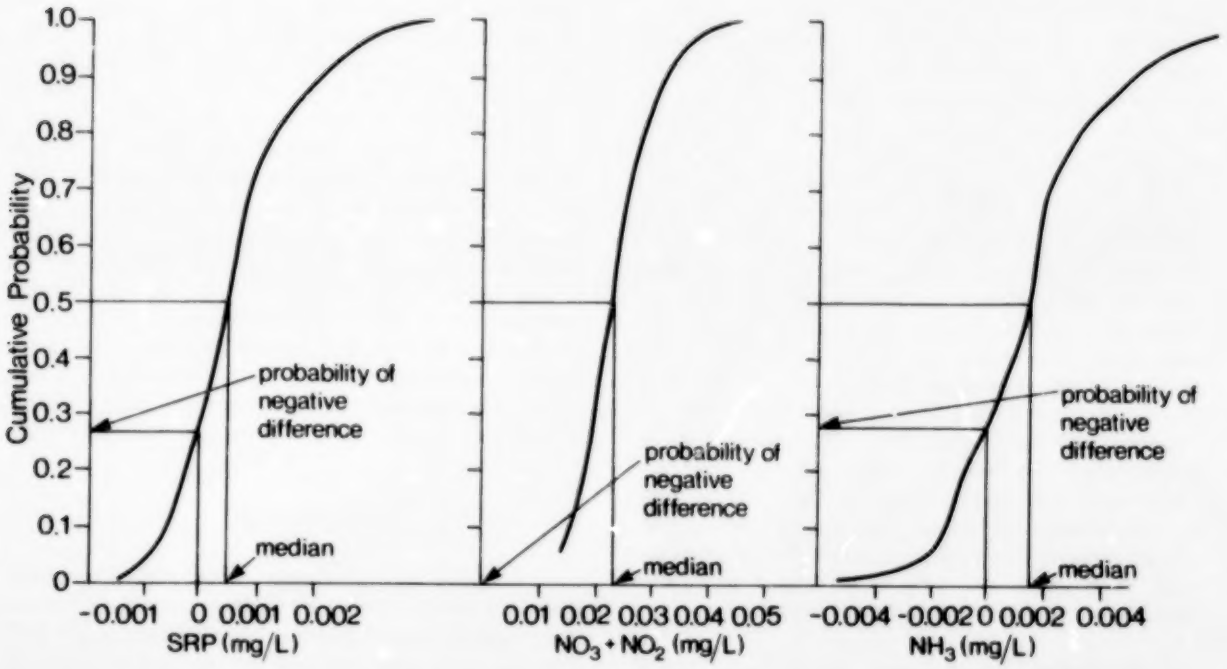

Figure 2. The empirical cumulative distribution functions for the differences between the shipboard and stored sample analyses (November 19-24).

Samples from each depth were filtered through 0.45-μm membrane filters, then split into two sets of replicates and stored in 125-mL glass bottles with plastic snap-on caps. One set was refrigerated (4°C) for future analysis; the other underwent immediate analysis in the shipboard laboratory for soluble reactive phosphorus, nitrate plus nitrite and ammonia. During the April 26-30 and November 19-24 cruises, 374 and 370 samples, respectively, were collected. Replicate analyses were conducted May 4-5 and November 24-25 following each cruise.

Soluble reactive phosphorus was measured using an automated colorimetric stannous chloride method. Nitrate plus nitrite was determined by an automated cadmium reduction, and ammonia, by an automated colorimetric phenate procedure (Environment Canada, 1979).

The statistical analyses were performed in the following manner. Let (x_i, y_i), $i = 1,2 \ldots n$ be the results available for each of the nutrients, where n is the number of split samples, x_i is the concentration of the nutrient if the chemical analysis was performed immediately (shipboard), and y_i is the corresponding concentration for the stored water sample. The common approach for testing the difference between x and y is to perform a matched paired t test. On inspection of the results, however, it was noted that some values of x and y were below the detection limit. To accommodate the censored data, modification of the paired t test would have been necessary. This posed a complicated computational problem, leading us to consider another approach which, although slightly less efficient than the t test (provided the difference $(x_i - y_i)$ is normally distributed), is well suited for use in case of censoring and results in robust inferences, i.e., inferences independent of the form of the distribution of $(x_i - y_i)$. This approach is the non-parametric sign test (Lehmann, 1975).

The Sign Test

The sign test is based on replacing the difference between the random variables x_i and y_i by a new random variable Z_i, which is defined as follows:

$$Z_i = \begin{cases} +1 & \text{if } x_i > y_i \\ -1 & \text{if } x_i < y_i \end{cases}$$

If $x_i = y_i$ the pair (x_i, y_i) is disregarded, since it supplies no information on the difference between x_i and y_i. Also the pair is disregarded when both x_i and y_i are below the detection level. Under the null hypothesis (H_0) of no difference between x_i and y_i, the random variable Z_i is binomial with probability = 0.5. The binomial distribution can be used to evaluate the exact significance level, α, for testing H_0 when M (the number of Z_i values) is small. For large M, an approximate value for α can be obtained using the normal approximation to the binomial distribution.

Estimation of the Size of the Difference

Lehmann (1975) showed that when the sign test is used, the most natural estimate for the difference between $(x_i - y_i)$ is the median of the differences.

Confidence Interval for the Difference

Let d_i be the difference between x_i and y_i $(i = 1,2 \ldots M)$ and $d_{(i)}$ be the ith largest value of d_i, i.e., $d_{(1)} \leq d_{(2)} \leq \ldots \leq d_{(M)}$. The 1-2 γ confidence interval for the median u can be expressed as $d_{(i)} \leq u \leq d_{(M+1-i)}$ and the value of i is determined from the equation

$$\text{Prob}(u \leq d_{(i)}) \simeq \Phi\left[\frac{2i-(N+1)}{\sqrt{N}}\right]$$

where Φ is the normal cumulative distribution function.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 lists the detection limits for the three nutrients and the number and percentage of samples reported below these levels. Also given are the median concentrations of the shipboard and stored sample analyses (x_i and y_i, respectively).

Figure 1 presents the plots of the empirical cumulative distribution functions (CDF) of the difference between the shipboard and stored sample analyses for the April cruise. The CDF for obtaining negative differences (i.e., storage results are higher than shipboard results) are 0.22, 0 and 0.64 for SRP, $(NO_3 + NO_2)$ and NH_3, respectively (Fig. 1). These values strongly indicate that the distribution is not symmetric about zero and that storage results in (i) the reduction of the concentrations of SRP and $(NO_3 + NO_2)$ and (ii) the increase of the concentration of NH_3. Also shown on each graph is the estimated median of the distribution which is larger than zero for SRP and $(NO_3 + NO_2)$ and smaller than zero for NH_3. The results for the November cruise are shown in Figure 2. The CDF for obtaining negative differences are 0.27, 0 and 0.28 for SRP, $(NO_3 + NO_2)$ and NH_3, respectively. Also, the medians of the three nutrients are larger than zero (Fig. 2). From this it appears that the results for SRP and $(NO_3 + NO_2)$ are consistent for the two cruises, whereas the NH_3 results indicate an opposite storage effect.

Table 2 presents the results of application of the statistical analysis to the nutrient data. The values of the

Table 1. Detection Limits, Number (and Percentage) of Samples Reported below These Levels and Medians of Shipboard and Stored (Laboratory) Sample Analyses

Nutrient	Detection limit (dl)	No. of samples < dl (%)				Median			
		April 26-30		November 19-24		April 26-30		November 19-24	
		Ship	Lab	Ship	Lab	Ship	Lab	Ship	Lab
SRP	0.0002	0(0)	5(1)	0(0)	0(0)	0.0047	0.0041	0.0046	0.0040
$NO_3 + NO_2$	0.005	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0.365	0.342	0.358	0.336
NH_3	0.001	50(13)	12(3)	23(6)	107(29)	0.002	0.003	0.004	0.003

Note: All concentrations are reported in milligrams per litre.

Table 2. Summary of the Statistical Analyses of the Three Nutrients

Cruise	Nutrient	No. of differences			Sign test	Median of differences	95% Confidence interval		% Change
		(−)	(+)	Total			Lower limit	Upper limit	
April 26-30	SRP	70	288	358	11.47*	0.0005	0.0004	0.0006	11
	$NO_3 + NO_2$	1	373	374	19.18*	0.025	0.024	0.027	7
	NH_3	192	108	300	− 4.91*	− 0.0015	− 0.0020	− 0.0009	− 75
November 19-24	SRP	94	257	351	8.65*	0.0005	0.0004	0.0006	11
	$NO_3 + NO_2$	0	370	370	38.42*	0.023	0.022	0.024	6
	NH_3	64	238	302	9.96*	0.0015	0.001	0.002	37

* Value is significant at the 1% level.

sign test are highly significant ($p < 0.01$) indicating (i) for the April cruise, storage resulted in an increase in the concentration of NH_3 and a reduction in the concentration of the other two nutrients and (ii) for the November cruise, storage resulted in a reduction in the concentration of the three nutrients. The estimates of the median of the difference between the ship and laboratory analyses and the limits of the 95% confidence interval for the median are also given in the table. The final column of the table lists the percent change in concentration resulting from storage, calculated as

$$\% \text{ change} = \frac{\text{Median of the difference } (x_i - y_i)}{\text{Median of shipboard analysis } (x_i)} \times 100$$

It appears that the percent change was constant for SRP and $(NO_3 + NO_2)$ for the two cruises, but substantially different for NH_3. This might be due to a change in the concentration of the nutrients in the samples, i.e., the November concentration of NH_3 was double that of the April cruise, whereas SRP and $(NO_3 + NO_2)$ concentrations remained relatively constant.

The loss of $(NO_3 + NO_2)$ and subsequent increase in NH_3 concentrations on the first cruise may be indicative of the dominant bacterial species present in the water at that time, i.e., nitrifying bacteria were more sensitive to low temperatures than were those responsible for ammonification (Klingaman and Nelson, 1976). Since the levels of both nutrients decreased on the November cruise, there must be another explanation, such as algal uptake or adsorption. Likewise, decreased SRP concentrations may be a result of phosphate utilization by a developing bacterial population (Gilmartin, 1967) or adsorption onto detritus.

In conclusion, storage of unpreserved water samples in glass bottles at 4°C has been found to be insufficient for the stabilization of SRP, $(NO_3 + NO_2)$ and NH_3 concentrations for periods extending up to eight days. Until better preservation techniques have been established, continued immediate (shipboard) analysis of these nutrients is recommended.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge the assistance of the Technical Operations Division for sample collection and the staff of the Water Quality Branch Ship Support Laboratory, especially Ms. M. Gregory for her excellent analytical work. Special thanks go to R. Stevens for his critical review of this report.

REFERENCES

American Public Health Association. 1971. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* 13th ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 874 pp.

Armstrong, F.A.J. 1972. Analysis of phosphorus compounds in natural waters. *In Analytical Chemistry of Phosphorus Compounds,* edited by M. Halmann, Wiley-Interscience, Wiley & Sons, New York, N.Y., 850 pp.

Bowditch, D.C., G.R. Edmond, P.J. Dunstan and J.A. McGlynn. 1976. Suitability of containers for storage of water samples. Australian Water Resources Council, Tech. Pap. No. 16, 39 pp.

Collier, A.W. and K.T. Marvin. 1953. Stabilization of the phosphate ratio of sea-water by freezing. Bull. U.S. Bur. Fish. 79: 71-76.

Cooper, L.H.N. 1937. The nitrogen cycle in the sea. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 22: 183-204.

Degobbis, D. 1973. On the storage of seawater samples for ammonia determination. Limnol. Oceanogr. 18(1): 146-150.

Eichholz, G.C., A.E. Nagel and R.B. Hughes. 1965. Adsorption of ions in dilute aqueous solutions on glass and plastic surfaces. Anal. Chem. 37: 863-868.

Environment Canada. 1979. *Analytical Methods Manual.* Water Quality Branch, Inland Waters Directorate, Ottawa.

Environmental Protection Agency. 1971. *Manual of Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes.* Cincinnati, Ohio, 327 pp.

Gilmartin, M. 1967. Changes in organic phosphorus concentration occurring during seawater sample storage. Limnol. Oceanogr. 12: 325-328.

Henriksen, A. 1969. Preservation of water samples for phosphorus and nitrogen determination. Satryck ur Vatten, 3: 247-254.

Howe, L.H. and L.W. Holley. 1969. Comparison of mercury II chloride and sulphuric acid as preservatives for nitrogen forms in water samples. Environ. Sci. Technol. 3: 478-483.

Jenkins, D. 1968. The differentiation, analysis and preservation of nitrogen and phosphorus forms in natural waters. Adv. Chem. Ser. No. 73, Trace Organics in Water, pp. 265-280.

Klingaman, E.D. and D.W. Nelson. 1976. Evaluation of methods for preserving the levels of soluble inorganic phosphorus and nitrogen in unfiltered water samples. J. Environ. Qual. 5(1): 42-46.

Kreps, E. 1934. Organic catalysts or enzymes in sea water. *In* James Johnstone Memorial Volume, edited by R.J. Daniel, Liverpool University, pp. 193-202.

Lehmann, E.L. 1975. *Nonparametrics: Statistical Methods Based on Ranks.* McGraw-Hill, New York, 457 pp.

Macdonald, R.W., F.A. McLaughlin and J.S. Page. 1980. Nutrient storage by freezing: data report and statistical analysis. Pacific Marine Science Report 80-2, 69 pp.

Marvin, K.T. and R.R. Proctor. 1965. Stabilizing the ammonia-nitrogen content of estuarine and coastal waters by freezing. Limnol. Oceanogr. 10: 288-290.

Murphy, J. and J.P. Riley. 1956. The storage of sea water samples for the determination of dissolved inorganic phosphate. Anal. Chim. Acta, 14: 213-320.

Newell, B.S. 1967. The determination of ammonia in sea water. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 47: 318-319.

Philbert, F.J. 1973. The effect of sample preservation by freezing prior to chemical analysis of Great Lakes waters. Proc. 16th Conf. Great Lakes Res., 1973, pp. 282-293. Int. Assoc. Great Lakes Res.

Redfield, A.C. and A.B. Keys. 1938. The distribution of ammonia in the waters of the Gulf of Mexico. Biol. Bull. 74: 83-92.

Strickland, J.D.H. and T.R. Parsons. 1968. A *Practical Handbook of Seawater Analysis.* Fish. Res. Board Can. Ottawa, 293 pp.

Thayer, G.W. 1970. Comparison of two storage methods for the analysis of nitrogen and phosphorus fractions in estuarine waters. Chesapeake Sci. 11: 155-158.

Environnement Canada Environment Canada

Comparaison des résultats des analyses immédiates d'éléments nutritifs solubles dans l'eau d'un lac et des résultats des analyses après conservation

M.A. Nelson et A.H. El-Shaarawi

ÉTUDE N° 138, COLLECTION DES RAPPORTS TECHNIQUES

DIRECTION GÉNÉRALE DES EAUX INTÉRIEURES
DIRECTION DE LA QUALITÉ DES EAUX

Environnement Canada
Environment Canada

Comparaison des résultats des analyses immédiates d'éléments nutritifs solubles dans l'eau d'un lac et des résultats des analyses après conservation

M.A. Nelson et A.H. El-Shaarawi

ÉTUDE N° 133, COLLECTION DES RAPPORTS TECHNIQUES

DIRECTION GÉNÉRALE DES EAUX INTÉRIEURES
RÉGION DE L'ONTARIO
DIRECTION DE LA QUALITÉ DES EAUX
BURLINGTON (ONTARIO) 1984

(Available in English on request)

© Ministre des Approvisionnements et Services Canada 1984

Nº de cat. En 36-503/133F

ISBN 0-662-92892-X

Table des matières

	Page
RÉSUMÉ	v
ABSTRACT	v
INTRODUCTION	1
MÉTHODES	2
Le test des signe	2
Estimation de l'importance de la différence	2
Intervalle de confiance pour la différence	2
RÉSULTATS ET DISCUSSION	2
REMERCIEMENTS	5
RÉFÉRENCES	5

Tableaux

1.	Limites de détection, nombre (et pourcentage) d'échantillons où les concentrations étaient inférieures à ces limites et médianes des dosages immédiats et différés	3
2.	Résumé des analyses statistiques des trois matières nutritives	3

Illustrations

Figure 1.	Probabilités cumulatives empiriques des différences entre les résultats des dosages immédiats et différés (26 au 30 avril)	4
Figure 2.	Probabilités cumulatives empiriques des différences entre les résultats des dosages immédiats et différés (19 au 24 novembre)	4

Résumé

Des échantillons d'eau ont été recueillis dans le lac Ontario en avril et en novembre, filtrés (0.45 μm) et analysés immédiatement à bord du bateau pour en déterminer les éléments nutritifs suivants : phosphore réactif soluble, nitrates et nitrites et ammoniac. Des doubles ont été conservés dans des bouteilles de verre à 4 °C et analysés dans l'espace de huit jours. L'analyse statistique montre que la teneur en phosphore réactif soluble a diminué de 11 % et de 13 % et celle des nitrates et des nitrites de 7 % et de 6 % alors que celle de l'ammoniac a augmenté de 75 % dans le cas d'une expédition et diminué de 37 % dans l'autre.

Abstract

Water samples were collected from Lake Ontario during April and November, filtered (0.45 μm) and immediately analyzed onboard ship for the nutrients soluble reactive phosphorus, nitrate plus nitrite, and ammonia. Replicates were stored in glass bottles at 4°C and reanalyzed within eight days. Statistical analysis showed that soluble reactive phosphorus decreased by 11% and 13% and nitrate plus nitrite by 7% and 6%, whereas ammonia increased by 75% on one cruise and decreased by 37% on the other.

Comparaison des résultats des analyses immédiates d'éléments nutritifs solubles dans l'eau d'un lac et des résultats des analyses après conservation

M.A. Neilson et A.H. El-Shaarawi

INTRODUCTION

Beaucoup de recherches (Eichholz et coll., 1965; Thayer, 1970; Bowditch et coll., 1976; Macdonald et coll., 1980) ont été consacrées à l'effet de la préservation et de la conservation des échantillons d'eau sur leurs caractéristiques chimiques. Le phosphore réactif soluble (PRS), les nitrates et les nitrites ($NO_3 + NO_2$) et l'ammoniac (NH_3) ont particulièrement retenu l'attention (Murphy et Riley, 1956; Gilmartin, 1967; Jenkins, 1968; Howe et Holley, 1969; Thayer, 1970; Armstrong, 1972; Degobbis, 1973; Klingaman et Nelson, 1976). Quand les échantillons sont conservés sans traitement, la concentration de ces matières peut changer considérablement et vite, dans les 20 min qui suivent le prélèvement (Collier et Marvin, 1953).

La technique optimale de préservation ne fait pas l'unanimité. Pour stabiliser le PRS, Collier et Marvin recommandent la congélation rapide et la conservation à des températures négatives. Strickland et Parsons (1968) conseillent l'analyse dans les 2 h qui suivent le prélèvement, en convenant que la congélation pourrait stabiliser l'échantillon pendant plusieurs mois. En étudiant les effects de la congélation sur la concentration des éléments nutritifs, Gilmartin (1967) et Philbert (1973) ont découvert que la concentration de PRS avait diminué dans les échantillons décongelés. Divers auteurs ont proposé le chlorure mercurique comme agent de préservation à combiner avec la réfrigération (*Environmental Protection Agency*, 1971; Klingaman et Nelson, 1976) ou la congélation (Jenkins, 1968; *American Public Health Association*, 1971). Cependant, Henriksen (1969) constate que, en présence de HgCl, la teneur du PRS augmente. Pour Bowditch et coll. (1976), la technique de préservation la plus acceptable est de conserver les échantillons dans des bouteilles de verre à 4 °C mais Murphy et Riley (1956) ainsi que Klingaman et Nelson (1976) lui imputent des variations importantes des concentrations de PRS. Murphy et Riley (1956) ont envisagé de conserver les échantillons à 20 °C, à l'obscurité, à l'aide de divers agents de préservation (fluorure de sodium, chloroforme, hydroxyde d'aluminium et carbonate de thorium). Leur conclusion, contestée seulement par Jenkins (1968), est que le chloroforme à 0.7 % en volume donne les meilleurs résultats.

Pour préserver les échantillons d'azote, Bowditch et coll. (1976) recommandent la conservation à 4 °C, mais Klingaman et Nelson (1976) et Thayer (1970) ont constaté que les concentrations variaient beaucoup. Jenkins (1968) conseille d'ajouter du chlorure mercurique avant la refrigération pour conserver l'ammoniac, les nitrates et les nitrites à court terme et, sauf pour les échantillons de nitrites, de l'acide sulfurique pour la conservation à long terme. Howe et Holley (1969) et l'*American Public Health Association* (1971) souscrivent à cette technique, mais celle-ci s'est révélée, par le passé, ne pas convenir à l'ammoniac (Kreps, 1934; Cooper, 1937; Redfield et Keys, 1938). La congélation a été recommandée comme solution de rechange (Marvin et Proctor, 1965; Klingaman et Nelson, 1976), mais Degobbis (1973) et Newell (1967) signalent des variations de concentration avec une variabilité accrue attribuable à la rupture des cellules végétales et animales au cours de la congélation et de la décongélation. On a trouvé que le phénol pouvait stabiliser le NH_3 pendant deux semaines (Degobbis, 1973).

La Direction de la qualité des eaux, région de l'Ontario, entreprend une grande variété d'études qui exigent le dosage du phosphore et de l'azote dans l'eau. Vu que les auteurs susmentionnés ne s'entendent pas, le dosage du phosphore réactif soluble, des nitrates + nitrites et de l'ammoniac, partout où c'est possible, a lieu sur place, au moment du prélèvement. Dans les autres cas, les échantillons sont conservés à 4 °C. En 1982, on a entrepris de déterminer de façon comparative si la concentration de ces matières nutritives était modifiée suite à la conservation. À cette fin, du 26 au 30 avril et du 19 au 24 novembre 1982, pendant des expéditions de surveillance sur le lac

Ontario, on a prélevé des échantillons. Les résultats de leur analyse ont été soumis à l'analyse statistique pour déterminer : (i) si la concentration de PRS, de $(NO_3 + NO_2)$ et de NH_3 avait effectivement changé suite à la conservation; si oui, dans quelle mesure; (ii) selon quel intervalle de confiance.

MÉTHODES

L'échantillonnage a eu lieu dans 94 stations sur le lac Ontario aux profondeurs de 1 m, 10 m et 25 m, ainsi qu'à 10 m et à 2 m du fond, en conditions isothermes et à la profondeur de 1 m, et à 1 m au-dessus et au-dessous de la thermocline ainsi qu'à 10 m et à 2 m du fond, durant la stratification thermique. Les échantillons prélevés à chaque profondeur ont été filtrés sur membrane à ouvertures de 0.45 μm puis dédoublés en deux séries de sous-échantillons et conservés dans des bouteilles de verre de 125 mL à capsule en plastique fermant par pression. Une série a été réfrigérée (4 °C) pour analyse ultérieure, l'autre immédiatement analysée dans le laboratoire de bord pour le phosphore réactif soluble, les nitrates, les nitrites et l'ammoniac. En avril et en novembre, 374 et 370 échantillons respectivement ont été prélevés. Les analyses différées ont été faites les 4 et 5 mai et les 24 et 25 novembre.

Le phosphore réactif soluble a été dosé par colorimétrie automatique au chlorure stanneux; les nitrates et les nitrites par une méthode automatique basée sur la réduction par le cadmium; l'ammoniac par colorimétrie automatique au moyen d'un phénate (Environnement Canada, 1979).

Les analyses statistiques ont été faites de la manière suivante ; soit (x_i, y_i), $i = 1,2...n$, les résultats du dosage de chaque matière; n, le nombre d'échantillons subdivisés; x_i, le résultat du dosage immédiat; y_i, celui du dosage différé. Ordinairement, pour mesurer l'écart entre x et y, on fait le test «t» sur les résultats appariés. Cependant, en examinant ceux-ci, on a constaté que quelques valeurs de x et de y étaient sous la limite de détection. Pour l'analyse des données interdites, le test «t» devait être modifié. Ceci posait un problème de calcul compliqué qui nous a conduits à considérer une autre méthode qui, si elle est moins efficace que le test «t» (à condition que les écarts entre x_i et y_i soient normalement distribués), convient bien en cas d'interdiction et permet des inférences solides (indépendantes de la forme de la distribution des (x_i-y_i)). Cette méthode est le test non paramétrique des signes (Lehmann, 1975).

Le test des signes

Dans ce test, on remplace la différence entre les variables aléatoires x_i et y_i par une nouvelle variable aléatoire Z_i qui se définit comme suit :

$$Z_i = \begin{cases} +1 & \text{si } x_i > y_i \\ -1 & \text{si } x_i < y_i \end{cases}$$

Si $x_i = y_i$, la paire (x_i, y_i) est écartée puisqu'elle n'apporte aucun renseignement sur la différence entre x_i et y_i. La paire est aussi écartée quand x_i et y_i sont sous la limite de détection. Dans l'hypothèse de zéro (H_0) où aucune différence n'existe entre x_i et y_i, la variable aléatoire Z_i est binomiale avec une probabilité = 0.5. La loi binomiale peut alors servir à évaluer le seuil exact de signification, α, pour tester H_0 quand M (le nombre de valeurs Z_i) est petit. Quand M est grand, une valeur approximative peut être obtenue pour α en utilisant l'approximation normale de la loi binomiale.

Estimation de l'importance de la différence

Lehmann (1975) a montré que l'estimation la plus naturelle de la différence entre x_i et y_i, quand on utilise le test des signes, est la médiane des différences.

Intervalle de confiance pour la différence

Soit d_i la différence entre x_i et y_i $(i = 1,2...M)$ et $d_{(i)}$ la $i^{ème}$ plus grande valeur de d_i, c'est-à-dire, $d_{(1)} \leq d_{(2)} \leq ... \leq d_{(M)}$. L'intervalle de confiance $1-2\gamma$ pour la médiane u peut s'exprimer ainsi : $d_{(i)} \leq u \leq d_{(M+1-i)}$ et la valeur de i est tirée de l'équation :

$$\text{Prob}(u \leq d_{(i)}) \simeq \Phi \left[\frac{2i-(N+1)}{\sqrt{N}} \right]$$

où Φ est la fonction cumulative de distribution normale.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le tableau 1 donne les limites de détection des trois matières nutritives et le nombre et le pourcentage d'échantillons qui sont sous ces limites. Il donne également la médiane des résultats des dosages immédiats et différés (x_i et y_i respectivement).

La figure 1 présente les courbes de la probabilité cumulative (PC) empirique de la différence entre les résultats de l'analyse immédiate et ceux de l'analyse différée (avril). Les PC de différence négative (c'est-à-dire que les

Tableau 1. Limites de détection, nombre (et pourcentage) d'échantillons où les concentrations étaient inférieures à ces limites et médianes des dosages immédiats (I) et différés (D)

Paramètre	Limite de détection (ld)	Nombre d'échantillons < ld (%)				Médiane			
		avril		novembre		avril		novembre	
		(I)	(D)	(I)	(D)	(I)	(D)	(I)	(D)
PRS	0.0002	0(0)	5(1)	0(0)	0(0)	0.0047	0.0041	0.0046	0.0040
$NO_3 + NO_2$	0.005	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0.365	0.342	0.358	0.336
NH_3	0.001	50(13)	12(3)	23(6)	107(29)	0.002	0.003	0.004	0.003

Note : Toutes les concentrations sont en milligrammes par litre.

Tableau 2. Résumé des analyses statistiques des trois matières nutritives

Expédition	Paramètre	Nbre de différences			Tests des signes	Médiane des différences	Limites de confiance à 95 %		
		nég.	pos.	total			inf.	sup.	% de var.
26 au 30 avril	PRS	70	288	358	11.47*	0.0005	0.0004	0.0006	11
	$NO_3 + NO_2$	1	373	374	19.18*	0.025	0.024	0.027	7
	NH_3	192	108	300	- 4.91*	- 0.0015	- 0.0020	- 0.0009	- 75
19 au 24 novembre	PRS	94	257	351	8.65*	0.0005	0.0004	0.0006	11
	$NO_3 + NO_2$	0	370	370	38.42*	0.023	0.022	0.024	6
	NH_3	64	238	302	9.96*	0.0015	0.001	0.002	37

*Valeur significative au niveau de 1 %

résultats des analyses différées sont plus élevés que ceux des analyses immédiates) sont 0.22, 0 et 0.64 pour le PRS, ($NO_3 + NO_2$) et NH_3, respectivement (fig. 1). Ces valeurs montrent fortement que la distribution n'est pas symétrique par rapport à l'origine et que la conservation a : (i) diminué la concentration du PRS et des ($NO_3 + NO_2$) et (ii) augmenté celle du NH_3. Sur chaque graphique paraît également la médiane estimative de la distribution, qui est positive pour le PRS et les ($NO_3 + NO_2$) et négative pour le NH_3. Les résultats pour l'expédition de novembre paraissent à la figure 2. Les PC de différence négative sont 0.27, 0 et 0.28 pour le PRS, les ($NO_3 + NO_2$) et le NH_3 respectivement. Les trois médianes sont également positives (fig. 2). Il semble donc que les résultats des dosages du PRS et des ($NO_3 + NO_2$) des deux expéditions soient cohérents tandis que ceux du dosage du NH_3 montrent que les effets de la conservation ont été contraires d'une fois à l'autre.

Le tableau 2 présente les résultats de l'analyse statistique des résultats des dosages. Le test des signes est très concluant ($p < 0.01$) et montre que : (i) en avril, la conservation a fait augmenter la concentration du NH_3 et diminuer celle des deux autres matières et (ii) en novembre, elle a fait diminuer la concentration des trois matières. L'estimation de la médiane de la différence entre les analyses immédiates et différées et les limites de l'intervalle de confiance de 95 % pour la médiane sont également données dans le tableau. La dernière colonne donne le pourcentage de variation de la concentration, due à la conservation, qui se calcule comme suit :

$$\% \text{ de variation} = \frac{\text{médiane de la différence } (x_i - y_i)}{\text{médiane de l'analyse immédiate } (x_i)} \times 100$$

D'une expédition à l'autre, ce pourcentage semble constant pour le PRS et les ($NO_3 + NO_2$), mais substantiellement différent pour le NH_3. Cela peut être dû à un changement de concentration dans les échantillons, c'est-à-dire, en novembre, la concentration du NH_3 était le double de celle d'avril, tandis que celle du PRS et des ($NO_3 + NO_2$) restait relativement constante.

La perte de ($NO_3 + NO_2$) et l'augmentation subséquente de la concentration du NH_3 par rapport à la première

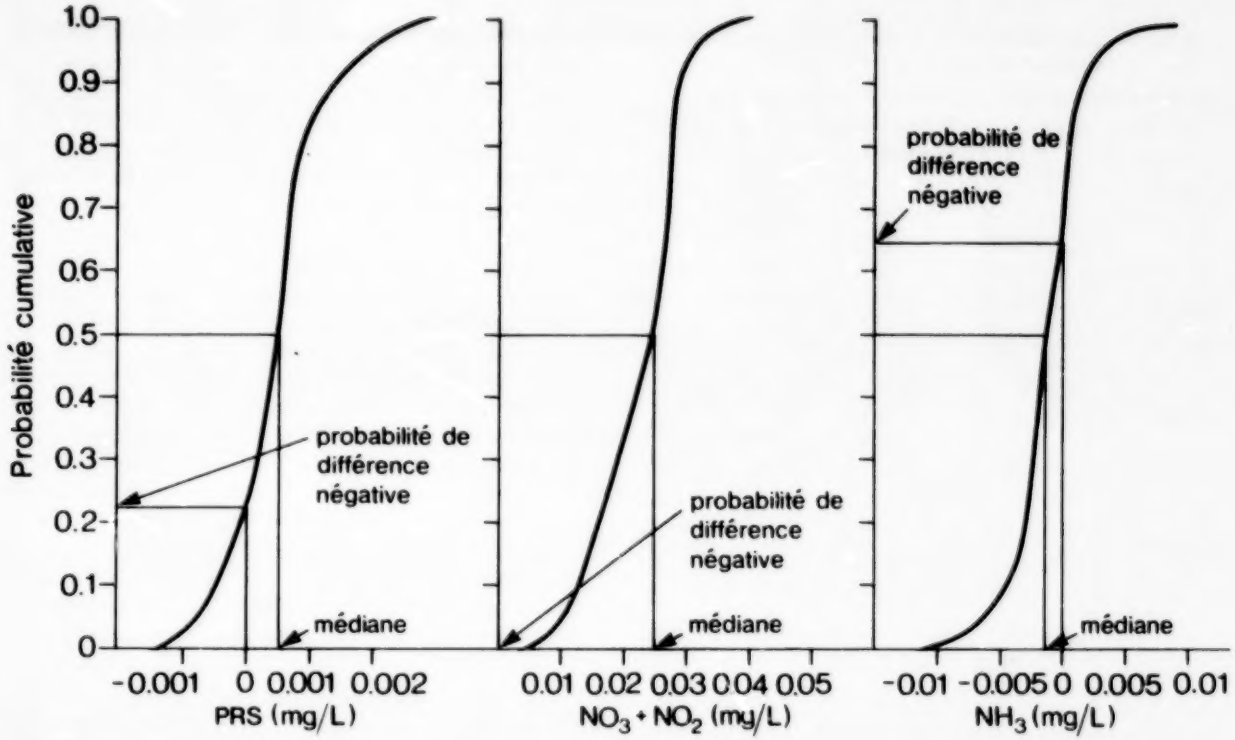

Figure 1. Probabilités cumulatives empiriques des différences entre les résultats des dosages immédiats et différés (26 au 30 avril).

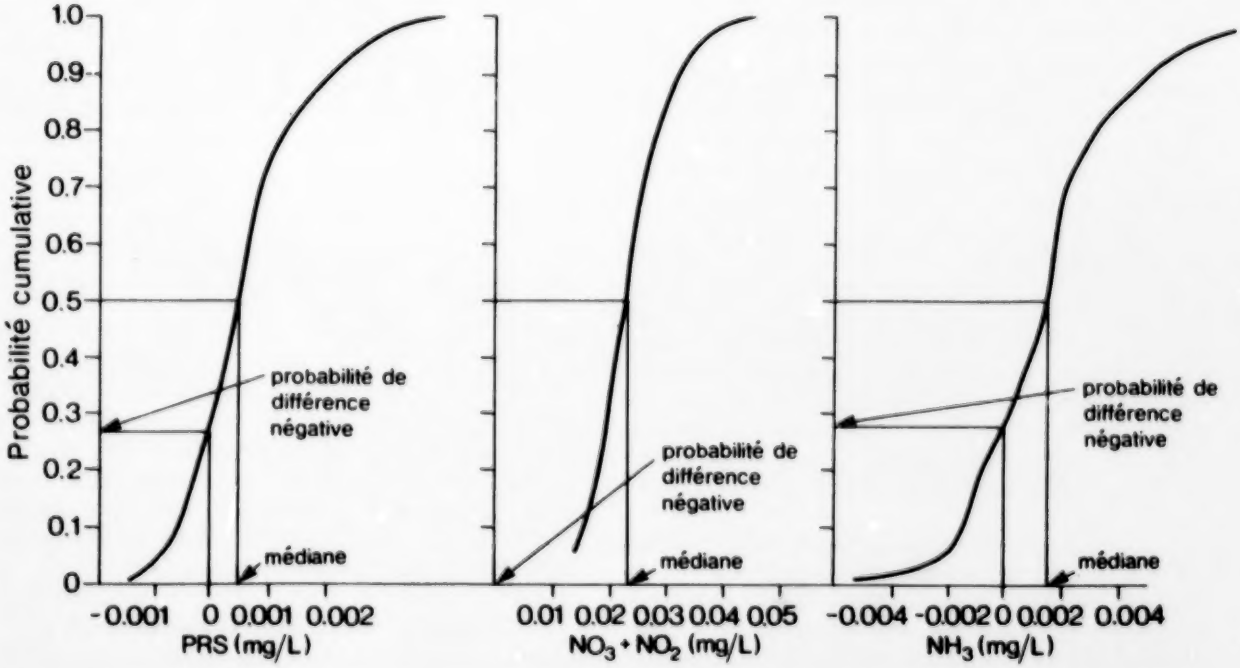

Figure 2. Probabilités cumulatives empiriques des différences entre les résultats des dosages immédiats et différés (19 au 24 novembre).

expédition peuvent donner une indication des espèces de bactéries dominantes présentes dans l'eau au moment du prélèvement, p. ex., les bactéries nitrifiantes étant plus sensibles au froid que celles qui causent l'ammonification (Klingaman et Nelson, 1976). Puisque les teneurs en ces deux matières avaient diminué en novembre, il doit y avoir une autre explication, telle que l'absorption par les algues ou l'adsorption. De même, la diminution des concentrations du PRS peut être due à l'utilisation des phosphates par une population bactérienne en croissance (Gilmartin, 1967) ou à l'adsorption sur les détritus.

En conclusion, la conservation d'échantillons d'eau, sans préservation, dans des bouteilles en verre à 4 °C s'est révélée insuffisante pour stabiliser le PRS, des (NO_3 + NO_2) et le NH_3 pour plus de 8 jours. Jusqu'à ce que de meilleures techniques de préservation soient trouvées, il est recommandé de s'en tenir à l'analyse immédiate.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la Division des opérations techniques pour le prélèvement des échantillons et le personnel du laboratoire auxiliaire embarqué de la Direction de la qualité des eaux, particulièrement Mme M. Gregory, pour son excellent travail d'analyse. Des remerciements spéciaux à R. Stevens qui a fait la révision critique du présent rapport.

RÉFÉRENCES

American Public Health Association. 1971. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.. 13e éd. American Public Health Association, Washington, D.C., 874 p.

Armstrong, F.A.J. 1972. Analysis of phosphorus compounds in natural waters. Dans *Analytical Chemistry of Phosphorus Compounds*, édité par M. Halmann, Wiley-Interscience, Wiley & Sons, New York, N.Y., 850 p.

Bowditch, D.C., G.R. Edmond, P.J. Dunstan et J.A. McGlynn. 1976. Suitability of containers for storage of water samples. Australian Water Resources Council, Doc. tech. nº 16, 39 p.

Collier, A.W. et K.T. Marvin. 1953. Stabilization of the phosphate ratio of sea-water by freezing. Bull. U.S. Bur. Fish. 79: 71-76.

Cooper, L.H.N. 1937. The nitrogen cycle in the sea. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 22 : 183-204.

Degobbis, D. 1973. On the storage of seawater samples for ammonia determination. Limnol. Oceanogr. 18(1): 146-150.

Eichholz, G.C., A.E. Nagel et R.B. Hughes. 1965. Adsorption of ions in dilute aqueous solutions on glass and plastic surfaces. Anal. Chem. 37: 863-868.

Environnement Canada. 1979. *Analytical Methods Manual*. Direction générale des eaux intérieures, Direction de la qualité des eaux, Ottawa.

Environmental Protection Agency. 1971. *Manual of Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes*. Cincinnati, Ohio, 327 p.

Gilmartin, M. 1967. Changes in inorganic phosphorus concentration occurring during seawater sample storage. Limnol. Oceanogr. 12: 325-328.

Henriksen, A. 1969. Preservation of water samples for phosphorus and nitrogen determination. Satryck ur Vatten, 3: 247-254.

Howe, L.H. et L.W. Holley. 1969. Comparison of mercury II chloride and sulphuric acid as preservatives for nitrogen forms in water samples. Environ. Sci. Technol. 3: 478-483.

Jenkins, D. 1968. The differentiation, analysis and preservation of nitrogen and phosphorus forms in natural waters. Adv. Chem. Ser. Nº 73, Trace Organics in Water, pp. 265-280.

Klingaman, E.D. et D.W. Nelson. 1976. Evaluation of methods for preserving the levels of soluble inorganic phosphorus and nitrogen in unfiltered water samples. J. Environ. Qual. 5(1) : 42-46.

Kreps, E. 1934. Organic catalysts or enzymes in sea water. Dans *James Johnstone Memorial Volume*, édité par R.J. Daniel, Université de Liverpool, pp. 193-202.

Lehmann, E.L. 1975. Nonparametrics : *Statistical Methods Based on Ranks*. McGraw-Hill, New York, 457 p.

Macdonald, R.W., F.A. McLaughlin et J.S. Page. 1980. Nutrient storage by freezing : data report and statistical analysis. Pacific Marine Science Report 80-2, 69 p.

Marvin, K.T. et R.R. Proctor. 1965. Stabilizing the ammonia-nitrogen content of estuarine and coastal waters by freezing. Limnol. Oceanogr. 10: 288-290.

Murphy, J. et J.P. Riley. 1956. The storage of sea water samples for the determination of dissolved inorganic phosphate. Anal. Chim. Acta, 14: 318-320.

Newell, B.S.1967. The determination of ammonia in sea water. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 47: 318-319.

Philbert, F.J. 1973. The effect of sample preservation by freezing prior to chemical analysis of Great Lakes waters. Proc. 16e Conf. Great Lakes Res., 1973, pp. 282-293. Int. Assoc. Great Lakes Res.

Redfield, A.C. et A.B. Keys. 1938. The distribution of ammonia in the waters of the Gulf of Mexico. Biol. Bull. 74: 83-92.

Strickland, J.D.H. et T.R. Parsons. 1968. A *Practical Handbook of Seawater analysis*. Fish. Res. Board Can. Ottawa, 293 p.

Thayer, G.W. 1970. Comparison of two storage methods for the analysis of nitrogen and phosphorus fractions in estuarine waters. Chesapeake Sci. 11: 155-158.

POOR

QUALITY

ORIGINAL